动 物 学 研 究 2013，Oct. 34(5): 479−486 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI:10.11813/j.issn.0254-5853.2013.5.0479

翘嘴红鲌（*Erythroculter ilishaeformis*）精子诱导的雌核发育团头鲂（*Megalobrama amblycephala*）细胞及其分子遗传学分析

陶 敏[#]，宋祯彦[#]，肖 军，刘少军[*]，罗凯坤，邹拓谜，王 军，刘 维，胡 婕，赵如榕，刘 筠

湖南师范大学 生命科学学院，教育部蛋白质化学与鱼类发育生物学重点实验室，湖南 长沙 410081

摘要：该研究运用紫外灭活的翘嘴红鲌（*Erythroculter ilishaeformis*）精子刺激团头鲂（*Megalobrama amblycephala*）卵子进行雌核发育，并于 0~4 ℃冷水刺激条件下获得雌核发育团头鲂群体。在此基础上，于细胞遗传学（DNA 含量测定、染色体数目检测及性腺发育观察）及分子遗传学水平（微卫星分析）研究了雌核发育团头鲂的细胞生物学以及遗传学性状。结果表明，雌核发育团头鲂 DNA 含量与普通团头鲂一致（2*n*=48），其外形特征与对照组极为相似，且均为雌性，为团头鲂性别决定方式（XY 型）提供了细胞遗传学依据。同时，微卫星结果表明，在普通团头鲂、雌核发育团头鲂及翘嘴红鲌 3 个群体中共扩增出 63 个等位基因，雌核发育团头鲂群体平均观测杂合度和平均期望杂合度均显著低于亲本，即经过一代雌核发育，雌核发育团头鲂基因纯合度显著高于普通团头鲂和翘嘴红鲌，已达到快速建立纯系的目的，且雌核发育团头鲂群体与普通团头鲂群体遗传距离接近，即雌核发育为母系遗传。该研究为团头鲂遗传选育及品系改良提供了遗传材料。

关键词：冷休克；雌核发育；团头鲂；生物学性状；微卫星

中图分类号：Q953[+].3; Q958.8 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2013)05-0479-08

Cytogenetic and molecular genetic analysis of gynogenesis in *Megalobrama amblycephala* using spermatozoa of *Erythroculter ilishaeformis*

Min TAO[#], Zhen-Yan SONG[#], Jun XIAO, Shao-Jun LIU[*]，Kai-Kun LUO, Tuo-Mi ZOU, Jun WANG, Wei LIU, Jie HU, Ru-Rong ZHAO, Yun LIU

Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of State Education Ministry of China, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081*, China*

Abstract: In the present study we used both cytogenetics (measurement of DNA content, detection of chromosome number, observation of gonadal development)and molecular genetics(microsatellite analysis)to analyze the biological characteristics of gynogenetic *M. amblycephala,* which were created through gynogenesis induced via UV-irradiated *E. ilishaeformis* spermatozoa to fertilize *M. amblycephala* eggs. The maternal genome was duplicated by cold shock in 0~4 °C cold water to form a population of *M. amblycephala* with 48 chromosomes whose DNA content was identical to the diploid maternal parent. Morphologically, this group of gynogenetic *M. amblycephala* was similar to the control group. All gynogenetic *M. amblycephala* were female, and no males were found in any of the examined gynogenetic *M. amblycephala*, providing cytogenetic evidence that our gynogenetic *M. amblycephala* are type XY. At the same time, microsatellite analysis showed that 63 alleles were amplified in the three test groups of gynogenetic *M. amblycephala*. Overall, the population of gynogenetic *M. amblycephala* observed heterozygosity average, and the expected average was significantly lower than the parental averages, demonstrating that after generation gynogenesis the gene homozygosity of *M. amblycephala* was significantly higher than the ordinary bream and *E. ilishaeformis,* making it a pure line. The genetic proximity of gynogenetic *M. amblycephala* to *M. amblycephala* demonstrates that gynogenesis passes on maternal DNA. Gynogenetic groups developed in this study may provide good genetic material for future breeding projects of *M.* amblycephala.

Keywords: Cold shock; Gynogenesis; *Megalobrama amblycephala*; Biological characteristics; Microsatellite

收稿日期：2013-02-27；接受日期：2013-05-10

基金项目：国家公益性行业科研专项（200903046）；国家高技术研究发展计划子课题（2011AA100403）；国家自然科学基金重点项目（30930071）；国家自然科学基金重大国际合作项目（31210103918）；高等学校博士学科点专项科研基金（20114306130001）；国家、湖南省发育生物学重点学科建设项目

[#]共同第一作者(Authors contributed equally to the work)

[*]通信作者（Corresponding author），E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

团头鲂（*Megalobrama amblycephala*）俗称鳊鱼，属鲤形目（Cypriniformes）鲤科（Cyprinidae）鲌亚科（Cultrinae）鲂属（*Megalobrama*）。其肉质嫩滑鲜美，原产于我国长江中游的湖泊中，系草食性经济鱼类（Zhang et al, 1991），现已推广到全国各地养殖。随着人工养殖业的逐步发展，各地团头鲂养殖群体出现了较严重的退化现象，表现为生长速度减慢、性成熟个体变小、体型变长、变薄及抗病能力差等（Li, 1988; Li et al, 1991; Li & Li, 1992）。因此，为优化团头鲂性状，缩短选种时间，有必要通过有效育种方法对其进行遗传改良。

人工诱导雌核发育技术在鱼类纯系的快速构建、性别决定和性别人工控制以及基因图谱建立等方面具重要意义。一次人工诱导雌核发育的纯度约相当于14个世代全同胞交配选育的结果，任何鱼类经过连续两次雌核发育即可作为纯系亲本用于育种生产。因此，人工雌核发育技术已作为鱼类遗传育种工程热点而被应用于数十种鱼类育种（Fan & Song, 1993; Lou, 1986; Sun et al, 2006, 2007; Taniguchi, 1992；Xiao et al, 2009）。国内已有多个实验室开展了对团头鲂种群和雌核发育团头鲂的研究，包括雌核发育群体的建立及生化遗传标记的初步研究等（Li et al, 1991; Tang et al, 2008; Zhao et al, 2000），但仍缺乏对雌核发育团头鲂细胞和分子遗传学等方面的系统分析。微卫星标记方法在鱼类群体遗传研究领域较为活跃（Ji et al，2008；Li et al, 2005；Zhu et al, 2006），因此，可运用该技术对普通团头鲂和雌核发育团头鲂后代进行群体遗传学分析。本研究通过使用翘嘴红鲌（*Erythroculter ilishaeformis*）灭活精子诱导团头鲂卵子获得雌核发育团头鲂群体，并运用微卫星分析法对普通团头鲂和雌核发育团头鲂群体以及翘嘴红鲌群体的遗传变异与亲缘关系进行群体遗传学分析，以期探讨雌核发育团头鲂群体的遗传多样性，为其群体建立、选育及遗传资源的保护与利用等奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

性成熟雌性团头鲂及普通团头鲂均取自湖南师范大学教育部多倍体鱼类繁殖及育种技术工程研究中心，翘嘴红鲌购买于湖南师范大学二里半菜市场。

1.2 方法

1.2.1 团头鲂雌核发育及雌核发育群体的生物学特性

在团头鲂于繁殖季节选取人工催产性成熟的雌性团头鲂和雄性翘嘴红鲌进行人工催产,获取卵子和精子。翘嘴红鲌精液用紫外灯照射灭活，并利用灭活的翘嘴红鲌精子刺激团头鲂的卵子，0~4 ℃水冷休克处理20~30 min，抑制其第二极体排出使卵子染色体加倍。全部卵子在室温（23~24 ℃）下流水孵化，直至鱼苗孵出。以普通团头鲂为参照，用流式细胞仪测定雌核发育团头鲂红细胞中的DNA含量。将得到的雌核发育团头鲂鱼苗饲养至成鱼后，分别对精子源——翘嘴红鲌、母本团头鲂和雌核发育团头鲂的形态学特征进行测量和比较。随机取5尾雌核发育团头鲂进行肾细胞染色体制备并在显微镜下观察分散较好的染色体形态，统计其染色体数及分布情况（Sun et al，2003）。对五月龄雌核发育团头鲂卵巢进行组织学切片观察，并用Pixera pro 600ES（美国）数码显微摄像系统拍照。性腺发育分期参考Liu（1993）采用的鲤科鱼类性腺分期标准。

1.2.2 普通团头鲂，雌核发育团头鲂和翘嘴红鲌微卫星检测

普通团头鲂（*n*=20）、翘嘴红鲌（*n*=20）及雌核发育团头鲂（*n*=20）每尾分别取血液2 mL, DNA的提取采用传统的酚/氯仿抽提法（Sambrook & Russell, 2002）。实验所用的15对微卫星引物是根据NCBI上的团头鲂微卫星序列（NCBI序列号为：FJ168686~FJ168700），运用Primer 5.0软件设计获得（表1）。PCR 扩增反应总体积为为20 μL, 包括：模板DNA约20~40 ng模板DNA，正、反向引物各0.25 μmol/L，Taq 酶0.6 U，$MgCl_2$ 20.8 μmol/L，dNTP 0.05 mmol/L和1×Taq 反应缓冲液。PCR 反应程序：94 ℃预变性5 min，94 ℃变性30 s，退火30 s（各对引物的特异退火温度见表1），72 ℃延伸45 s，35个循环，72 ℃终延伸10 min。扩增产物用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，电压200 V，电泳8 h。银染法染色，显色后用GDS7500 凝胶成像分析系统进行扫描, 每组微卫星引物扩增出的DNA分子量大小用GelWorks1D软件（3.0版本）进行估算。用CREATE（Coombs et al, 2008）软件将微卫星基因型数据转换成FSTAT（Goudet, 1995）格式。利用FSTAT软件进行数据处理。群体内个体间的遗传相似系数按照Nei & Li（1979）的相似率公式计算：$S_{xy}=2N_{xy}/N_x+N_y$），其中，N_x和N_y分别为个体x和y的DNA扩增片段数目，N_{xy}表示个体x和y之间共有的DNA扩增片段数目。采用公式$D=1-S_{xy}$计算群体间个体的遗传距离。

表 1　团头鲂 15 个微卫星位点的引物序列及 PCR 反应条件

Table 1　Primer sequences and PCR condition of 15 microsatellite loci in *Megalobrama amblycephala*

座位 Locus	重复单元 Repeat motif	引物序列（5′-3′） Primer sequences（5′-3′）	退火温度（℃） T_a（℃）	片段长度范围（bp） Size range（bp）	GenBank 号 GenBank access Nos.
TTF01	（CA）$_{21}$	F: TGGAGATGAAAGCTGAAGGAA R: ATGCACGAACTGCCACATAA	55.9	252~328	FJ168686
TTF02	（CA）$_5$（CT）$_{21}$	F: AAACAGCTGCTACCCTTGGA R: TTTGCCAGAAGAGCAAATCA	55.9	196~228	FJ168687
TTF03	（TC）$_{27}$	F: AAGACGCCACGGAAACTTTA R: CTGACCGGATAGCAAAGTGA	56.4	214~266	FJ168688
TTF04	（CA）$_{14}$	F: GACTGGAGTCGTCAGGCTTC R: TGCCCCACATTGTTAGACTG	60.5	182~222	FJ168689
TTF05	（CA）$_{15}$	F: CTAGTGGGTAGGTGGCAGGT R: TGACTGGGAGAGACAGAGGAG	60.5	164~188	FJ168690
TTF06	（GA）$_{13}$	F: GGCAGGTCAGGCACATTTAT R:TCTCTACCTCACATTCTCTCATTCT	60.5	186~218	FJ168691
TTF07	（GT）$_{13}$	F: ATGGGTAAGCCGATGGATTC R: GTGTCAGCATTCCAGCTCCT	60.5	285~331	FJ168692
TTF08	（GT）$_{18}$	F: GGGGAAATAAAGGGAGAAAGTG R: TTTCTCCTGATCCGTTGACC	60.5	178~224	FJ168693
TTF09	（TC）$_{19}$	F: AAGACGCCACGGAAACTTTA R: GAGGTGGGACTGTGTGGAAT	56.9	269~319	FJ168694
TTF10	（GT）$_{22}$	F: AGCACTTTCTGTTGTGAAGC R: CCAGTGTAATACCCATGTCAT	51.9	255~291	FJ168695
TTF11	（AC）$_{11}$	F:AGCCCTAAAAATAGAGCCCT R:CCTTTTATGTGGCAGTTCGT	52.9	192~243	FJ168696
TTF12	（CA）$_{12}$	F:GGGTGTCAGAGGAGATATGGA R:TTCCCATCTCTGTAGTGGCTT	54.7	164~185	FJ168697
TTF13	（TG）$_{12}$	F:TGGAGAGTCCACGTAAACCAT R:CACACACTTGCAACAGCAGAT	55.9	162~190	FJ168698
TTF14	（CA）$_{12}$	F:GGGTGTCAGAGGAGATATGGA R:TTCCCATCTCTGTAGTGGCTT	53.7	164~185	FJ168699
TTF15	（CA）$_{13}$（AT）$_7$	F: ACGTGATTCATCAGACCAGGT R:CGCACCTAACATAAACGTTTG	55.1	186~254	FJ168700

F：正向引物；R：负向引物；Ta：退火温度。

F: forward primer; R: reverse primer；Ta: annealing temperature.

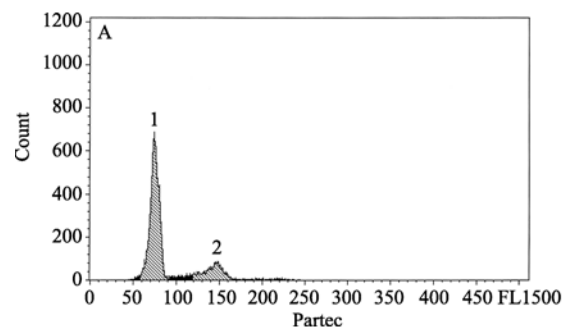
2　结果

2.1　生物学性状分析

于孵化期间统计胚胎受精率和孵化率。在用灭活翘嘴红鲌精子人工诱导雌核发育团头鲂的过程中，85%～90%的胚胎能发育至原肠胚，35%～40%的胚胎能发育至脱膜。

以普通团头鲂为参照，用流式细胞仪测定雌核发育团头鲂红细胞的 DNA 含量（图 1），结果表明，雌核发育团头鲂与普通团头鲂的 DNA 平均含量分别为 74.55 和 72.76，两者的 DNA 平均含量比值为 0.944，即两者 DNA 含量相同, 含量比值与预计 1:1 的理论比值无显著差异（P>0.05）。

所得鱼苗饲养至 3～4 个月后，随即抽样，分别取团头鲂、翘嘴红鲌和雌核发育团头鲂各 10 尾，测



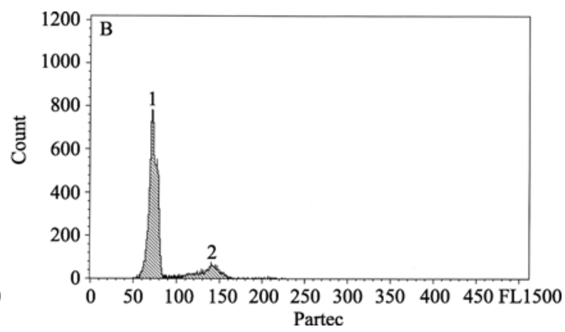


图 1　流式细胞仪 DNA 含量峰值分析图

Figure 1　Cytometric histograms of DNA fluorescence

A：普通团头鲂（1 号峰：74.55）；B：雌核发育团头鲂（1 号峰：72.76）。

A：Maternal *M.amblycephala*（peak 1: 74.55）; B: Gynogenesis *M. amblycephala*（peak 1:72.76）.

量分析其可量可数性状，对比团头鲂和翘嘴红鲌成鱼的各项数据。结果表明：雌核发育团头鲂基本保留了团头鲂的大部分可数性状特征，两者外形基本一致（图2，表2）。

采用肾细胞分裂中期染色体倍性检测法抽样检测雌核发育团头鲂体细胞染色体数目，并对随机抽样的5尾雌核发育团头鲂中期分裂相（40个/尾）进行计数及统计分析。雌核发育团头鲂染色体数目为44～48，处于众数范围内的细胞占观察细胞总数的92.1%，可确定为二倍体（2*n*=48）（图3）。



图2 雌核发育团头鲂外形图

Figure 2 Appearance of gynogenetic *M. amblycephala*

表2 雌核发育团头鲂、团头鲂及翘嘴红鲌的可数性状

Table 2 Physical traits of *Megalobrama amblycephala*, *Erythroculter ilishaeformis* and Gynogenesis *Megalobrama amblycephala*

类别 Species	特征 Features					
	侧线鳞 Lateral line scales	侧线上鳞 Top of Lateral line scales	侧线下鳞 Below of Lateral line scales	背鳍条 Dorsal fins	腹鳍条 Pelvic fins	臀鳍条 Anal fins
普通团头鲂 *M. amblycephala*	49～52	9～10	9～11	Ⅲ+8～9	8～10	Ⅲ+25～27
翘嘴红鲌 *E. ilishaeformis*	80～92	16～20	6～7	Ⅲ+7	9	Ⅲ+20～23
雌核发育团头鲂 Gynogenesis *M. amblycephala*	53～58	12～14	10～12	Ⅲ+8～9	9～10	Ⅲ+26～27

大写罗马数字代表硬棘条数目，阿拉伯数字代表鳍条数目。

Uppercase Roman numerals represent the numbers of spine strips, Arabic numerals represent the numbers of fins.

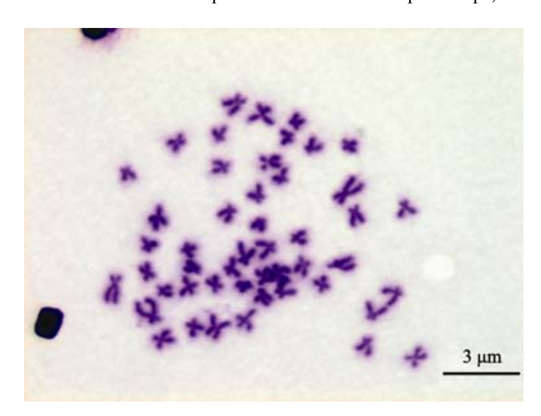


图3 雌核发育团头鲂染色体中期分裂相（2*n*=48）

Figure 3 Chromosome metaphases of gynogenetic *M.amblycephala*（2*n*=48）

检查连续两年内得到的经雌核发育处理的团头鲂后代，发现每百尾鱼中存在4～8尾整合了父、母本特征的个体，其特点为：体侧扁而高，头小嘴上翘，侧线鳞片较大，鳞片较薄软，体长较长。经外型观察和分子标记鉴定为鲂、鲌杂交鱼。排除鲂、鲌杂交鱼后观察雌核发育团头鲂个体发现，无一尾鱼能挤出精液。随机解剖24月龄雌核发育团头鲂后，肉眼可见粉红色性腺。性腺组织学切片观察可见雌核发育团头鲂性腺结构与母本团头鲂相似，卵巢处于III期，其中均匀分布有许多III时相卵母细胞，发育正常（图4）。

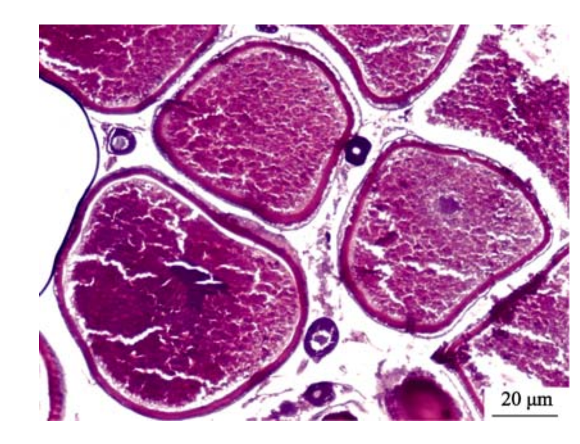


图4 雌核发育团头鲂性腺结构

Figure 4 Gonad structure of gynogenetic *M. amblycephala*

2.2 微卫星结果分析

所采用的15对微卫星引物在普通团头鲂、雌核发育团头鲂及翘嘴红鲌中共扩增出63个等位基因，大小为100～300 bp，每对引物检测到的等位基因为2～8个（附表1）。扩增图谱显示，每对引物在不同个体间存在明显多态性，个体间一致性较

多,大多呈纯合子, 雌核发育团头鲂多态性条带少于普通团头鲂和翘嘴红鲌。在 3 个群体中, 雌核发育团头鲂群体的平均等位基因丰富度（A_R）、平均观测杂合度（Obs_H_E）和平均期望杂合度（Exp_H_E）最低, 而平均观测纯合度（Obs_H_O）和平均期望纯合度（Exp_H_O）最高（表 3），显示经过一代雌核发育，该群体多态性降低，纯合度显著升高，达到了快速建立纯系的目的。

根据筛选出的15对微卫星引物扩增结果，计算普通团头鲂、雌核发育团头鲂及翘嘴红鲌的遗传相似系数和遗传距离（表4）。结果表明，雌核发育团头鲂与普通团头鲂间的遗传相似系数为0.9042，与翘嘴红鲌的遗传相似系数为0.5863，说明雌核发育团头鲂基本遗传了母本团头鲂的性状，而翘嘴红鲌的灭活精子仅起到了激活卵细胞的刺激作用。NJ遗传聚类树（图5）则更直观地证明了该观点。

表 3　普通团头鲂、雌核发育团头鲂及翘嘴红鲌群体的变异参数

Table 3　Genetic variation parameters of *M. amblycephala*, *E. ilishaeformis* and gynogenetic *M. amblycephala*

群体 Population	平均观察纯合度 Obs_H_O	平均观察杂合度 Obs_H_E	平均期望纯合度 Exp_H_O	平均期望杂合度 Exp_H_E	平均等位基因丰富度 A_R
普通团头鲂 *M. amblycephala*	0.2923	0.7077	0.1874	0.8126	3.3092
雌核发育团头鲂 Gynogenetic *M. amblycephala*	0.6214	0.3786	0.7394	0.2606	2.4124
翘嘴红鲌 *E. ilishaeformis*	0.2538	0.7462	0.1705	0.8295	3.3701

表 4　团头鲂、翘嘴红鲌和雌核发育团头鲂群体遗传相似系数（Nei 氏法）和遗传距离

Table 4　Nei's genetic identity and genetic distance between *M. amblycephala*, *E. ilishaeformis*, and gynogenetic *M. amblycephala* populations.

群体 Population	团头鲂 *M. amblycephala*	翘嘴红鲌 *E. ilishaeformis*	雌核发育团头鲂 Gynogenetic *M. amblycephala*
团头鲂 *M. amblycephala*	**	0.6932	0.9042
翘嘴红鲌 *E.ilishaeformis*	0.3664	**	0.5863
雌核发育团头鲂 Gynogenetic *M. amblycephala*	0.1007	0.5340	**

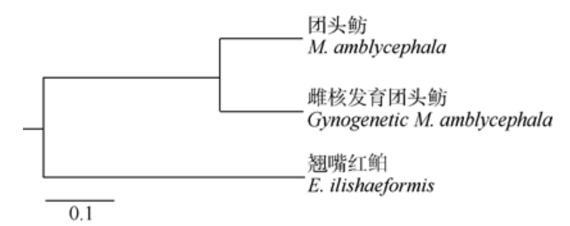


图 5　Nei 氏（1978）聚类分析构建群体间 NJ 聚类树

Figure 5　Neighbor-joining（NJ）tree of *M. amblycephala*, *E. ilishaeformis*, and gynogenetic *M. amblycephala* populations based on Nei's（1978）unbiased genetic distance

通过计算3个群体的遗传相似系数和遗传距离发现，雌核发育团头鲂个体间的遗传相似系数很大（S=0.9075）（表5），接近于理论值（1）,说明经过一代的雌核发育，遗传纯度已大幅度提高，基本达到建立纯系的目的。普通团头鲂和翘嘴红鲌个体间的遗传相似系数均适中（分别为S=0.5466和S=0.4658），说明这两个群体多态性高，遗传杂合度高，符合天然野生群体特征。

表 5　普通团头鲂、雌核发育团头鲂和翘嘴红鲌群体内部遗传相似系数和遗传距离

Table 5　Genetic identity and genetic distance within *M. amblycephala*, *E. ilishaeformis*, and gynogenetic *M. amblycephala* populations

群体 Population	遗传相似度平均值 Average genetic identity	遗传距离平均值 Average genetic distance
普通团头鲂 *M. amblycephala*	0.5466	0.4534
雌核发育团头鲂 Gynogenetic *M. amblycephala*	0.9075	0.0925
翘嘴红鲌 *E. ilishaeformis*	0.4658	0.5342

3 讨 论

团头鲂为我国经济淡水鱼类，具有较高研究价值（如生物演化、种群扩张、食用经济价值和营养研究等）。人工选择育种可以消除或减少不利性状基因，而人工诱导雌核发育技术则可快速建立纯系和并稳定遗传优良性状，是进行人工选育和复壮的良好方法。直至目前，雌核发育群体的低存活率低（Lou, 1986）及其后代的鉴定是限制该技术在水产养殖中应用的主要障碍。成活率低的原因有两个，第一，刺激源精子必须经过紫外照射灭活，因此，精子活力无法保证，第二，染色体加倍所需经过的 0~4 ℃水冷休克会伤害一部分卵细胞，导致孵化效率低。早期研究表明减少冷休克时间及使用亲缘关系较远的精子能提高孵化效率（Sun et al, 2006；Sun et al, 2007）。本研究适当延长冷休克处理时间，提高了染色体加倍效率及雌核发育团头鲂存活率。

雌核发育后代检测验证值得深入探讨。使用杂交后代不育且亲缘关系远的灭活精子激活是简单有效的鉴别方法，检测 DNA 含量及染色体数目也为可行措施，此外，性腺发育状况也可作为验证雌核发育的良好指标，亲缘关系较远的父母本杂交会推迟子代性腺发育（Xiao et al, 2011）。本研究选择翘嘴红鲌精子作为刺激源有其独特的优势，远缘杂交后代外形特征与父、母本均存在较大差别，这是由于杂交后代受到父、母本两者的遗传性状影响，因此，从外形上即可判别是否为雌核发育个体。雌核发育团头鲂个体与母本团头鲂外形极其相似，体侧扁而高，呈菱形，头较小，头后背部急剧隆起。而杂交后代鲂鲌外形特征则整合了父、母本特征，体侧扁而高，头小嘴上翘，侧线鳞片较大，鳞片较薄软，体长较长（Ge, 2011）。本研究发现经雌核发育处理后的后代中每百尾鱼中存在 4～8 尾整合了父、母本特征的个体，外形观察和分子标记鉴定其为鲂、鲌杂交鱼（数据未发表），其原因可能是精子在进行紫外线灭活处理时既要保证精子活力又要使其遗传物质灭活，但紫外光照射时间难以把握，从而导致极少数遗传物质未散失的正常精子与团头鲂卵细胞结合形成了杂交鱼。鲂、鲌杂交个体的存在，证明了以团头鲂为母本，翘嘴红鲌为父本的杂交后代可育，能形成新的杂交品系，这也是今后本实验室的研究方向之一。

3.1 雌核发育团头鲂细胞生物学性状分析

多数生物体细胞的性染色体为一对性状互不相同的同源染色体，性染色体以外的染色体统称为常染色体。鱼类性染色体处于进化的原始状态，大多数鱼类的性染色体和常染色体无法区分，仅少数鱼类的性染色体得到了验证（Xiao et al, 2009）。性染色体决定性别的方式主要有ZW型和XY型，在XY型性别决定中又存在XO/XX型和复性染色体型（Li & Li, 2001）。在哺乳动物性别决定中，X和Y染色体所起的作用是不对等的，Y染色体短臂的“睾丸决定”基因具决定“男性”的强烈作用，而X染色体几乎不起作用，合子中只要有Y就发育成雄性，仅有X染色体（XO）则发育成雌性（Li, 2003）。在鱼类性别决定机制上，人工雌核发育技术无疑是适合的方法。本研究发现，雌核发育团头鲂群体中均为雌性，雌核发育系母系遗传，父本翘嘴红鲌异源灭活精子仅起到了激活卵子的作用，子代仅接受母本遗传物质而全部发育成雌性，即团头鲂的性别决定方式为XY型。

本研究发现雌核发育团头鲂基本上保留了团头鲂的大部分可数性状特征，但侧线鳞片数与侧线上鳞片数则偏离团头鲂而靠近翘嘴红鲌。这很可能是由于翘嘴红鲌精子基因组虽未整体进入卵子，但某些 DNA 片段仍然进入了团头鲂卵子，在一定程度上影响了子代性状表达，对雌核发育团头鲂中表现了异精效应（Liu et al, 2004）。

3.2 雌核发育团头鲂的微卫星分析

微卫星是共显性遗传，本研究利用 15 对引物在 3 个群体中均扩增出 2~8 条片段，原因可能是这些片段在基因组中为多拷贝（Opperman, 1983）。由于雌核发育后代二倍体的基因组均来自于母本，属于母系遗传，是高度的纯合子,因此，一次有丝分裂雌核发育相当于 8~10 个世代同胞兄妹交配，一次有丝分裂加一次极体雌核发育即可获得纯系（Streisinger et al, 1981），本研究表明雌核发育团头鲂与普通团头鲂群体的遗传相似度为 0.9042，大于雌核发育团头鲂与翘嘴红鲌群体的遗传相似度 0.5340，从而更加证实了雌核发育团头鲂属于母系遗传基因组。雌核发育团头鲂个体间遗传相似度 S=0.9075，也大于普通团头鲂个体间遗传相似度 S=0.5466，说明经过一代的雌核发育，遗传多样性已大大降低，基本达到了建立纯系的目的。但是从微卫星扩增图谱来看，雌核发育团头鲂仍存在一定

程度的杂合现象，这是因为通过抑制第二极体排出的方式诱导雌核发育时，减数分裂染色体加倍的过程中会产生同源染色体的联会和交换，而后代的杂合程度就有赖于减数分裂过程中的交换次数（Xiao et al, 2011）。

基因杂合度表示群体中某座位为杂合子的比例, 是度量群体遗传变异关系的最合适参数（Nei, 1978）。位点平均杂合度近似反映遗传结构变异程度的高低，杂合度越大，变异越大，遗传多样性越高（Wang et al, 2011）。建立雌核发育群体的目的在于产生快速有效的纯系，基因杂合度能很好反映该群体是否已达到建立纯系的目的。本研究结果显示，雌核发育团头鲂群体平均观测杂合度为0.3786，低于普通团头鲂群体（0.7077），从母本到子代经历一次雌核发育之后，其基因杂合度显著降低，纯合度极大提高。但数据显示雌核发育团头鲂平均观测杂合度 0.3786 高于平均期望杂合度0.2606，表明其并未完全达到预期纯合度，群体中还存在一定数量的杂合子，需要在后续实验中再次进行雌核发育，估计 2～3 代的雌核发育可以培育出较为纯系的子代。单倍体个体仅具一套单一基因组，因此，可用于建立鱼类遗传图谱（Lie et al, 1994），但单倍体一般难以成活，而雌核发育团头鲂为具有完整基因组的纯合子，是建立遗传图谱的最佳材料。

本研究对雌核发育团头鲂相关生物学性状进行了分析，并利用微卫星技术对其进行了初步遗传分析比较，为其群体建立及遗传育种提供了理论依据。

参考文献：

Coombs JA, Letcher BH, Nislow KH. 2008. Create: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. Mol Ecol Resour, 8（3）:578–580.

Fan ZT, Song SX. 1993. Gynogenesis, antrogenesis and hybridogenesis in fishes. *Journal of Fisheries of China,* **17**（2）: 179-186. [范兆廷, 寮苏祥. 1993. 鱼类的雌核发育、雄核发育和杂种发育. 水产学报, **17**（2）: 179-186.]

Ge LR. 2011. The Biological Characteristics and Genetic Analysis of the F_1 Hybrid of Megalobrama Amblycephala（♀）×Erythroculter Ilishaeformis（♂）. Master thesis, Hunan Nomal University. [葛玲瑞. 2011. 团头鲂（♀）×翘嘴红鲌（♂）杂交 F_1 的生物学特征及遗传分析. 硕士毕业论文, 湖南师范大学.]

Goudet J. 1995. FSTAT（version 1. 2）: a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity,* **86**（6）: 485-487.

Ji X, Sun XW, Yang LG, Li YJ, Liu HJ. 2008. Paternity testing of mitogynogenetic Japanese Flounder（*Paralichthys olivaceus*）using microsatellite loci. *Zoological Research,* **29**（1）: 25-30. [季旭, 孙效文, 杨立更, 李雅娟, 刘海金. 2008. 微卫星标记对牙鲆有丝分裂雌核发育家系的亲子鉴定. 动物学研究, **29**（1）: 25-30.]

Li JZ, Liu SJ, Zhang XJ, Lu SQ, Liu Y. 2005. Microsatellite marker analysis of genetic variation between the allotetraploid crucian-carp and their original parents. *Acta Genetica Sinica,* **32**（4）: 378-383.

Li M, Li JY. 2001. Mechanism of sex determination. *China Contemporary Medicine,* **7**（2）: 53-56, 48. [李明, 李江源. 2001. 性别决定的分子机制. 当代医学, **7**（2）: 53-56, 48.]

Li SF. 1988. Conservaton of the genetic performance of fish breeding poulations. *Journal of Fisheries of China,* 12（3）: 283-290. [李思发. 1988. 鱼类繁育群体遗传性能的保护. 水产学报, **12**（3）: 283-290.]

Li SF, Li GL. 1992. A primary study on the effect of one-generation outbreeding and inbreeding selection on the genetic variation of Megalobrama amblycephala. *Journal of Aquaculture,* **1**（6）: 13-15. [李思发, 李广丽. 1992. 一代远近交选育对团头鲂遗传变异的影响的初步研究. 水产养殖, **1**（6）: 13-15.]

Li SF, Cai WQ, Zhou BY. 1991. Morphological and biochemical genetic variations among populations of blunt snout bream（*Megalobrama amblycephala*）. *Journal of Fisheries of China,* **15**（3）: 204-211. [李思发, 蔡完其, 周碧云. 1991. 团头鲂种群间的形态差异和生化遗传差异. 水产学报, **15**（3）: 204-211.]

Li XH. 2003. Mammalian of Sex Determination. *Animal Science and Veterinary Medicine,* **20**（6）: 47-58. [李喜和. 2003. 哺乳动物的性别决定. 动物科学与动物医学, **20**（6）: 47-58.]

Lie Ø, Slettan A, Lingaas F, Olsaker I, Hordvik I, Refstie T. 1994. Haploid gynogenesis: a powerful strategy for linkage analysis in fish. *Animal Biotechnology*, **5**（1）: 33-45.

Liu SJ, Sun YD, Zhang C, Luo KK, Liu Y. 2004. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids red crucian carp × common carp. *Aquaculture,* **236**（1-4）: 193-200.

Liu Y. 1993. Propagation Physiology of Main Cultivated fish in China. Beijing: Agricultural Publishing House, 147-148. [刘筠. 1993. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 147-148.]

Lou YD. 1986. Artificial gynogenesis and its application in genetics and aquaculture. *Journal of Fisheries of China*, **10**（1）: 111-123. [楼允东. 1986. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用. 水产学报, **10**（1）: 111-123.]

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics,* **89**（3）: 583-590.

Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **76**（10）: 5269-5273.

Opperman K. 1913. Die Entwicklung von Forelleneiern nach Befruchtung mit radiumbestrahlten Samenfäden. *Archiv für mikroskopische Anatomie,* **83**（1）: AA307-AA323.

Sambrook J, Russell DW. 2002. The Condensed Protocols from Molecular

Cloning: A Laboratory Manual. Beijing: Science Publishing House. [萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 2002. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社.]

Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish（*Brachydanio rerio*）. *Nature,* **291**（5813）: 293-296.

Sun YD, Zhang C, Liu SJ, Tao M, Zeng C, Liu Y. 2006. Induction of gynogenesis in Japanese Crucian Carp（*Carassius cuvieri*）. *Acta Genetica Sinica*, **33**(5): 405-412. [孙远东, 张纯, 刘少军, 陶敏, 曾琛, 刘筠. 2006. 人工诱导雌核发育日本白鲫. 遗传学报, **33**（5）: 405-412.]

Sun YD, Liu SJ, Zhang C, Li JZ, Huang WR, Zhang J, Luo KK, Zhou GJ, Liu Y. 2003. The chromosome number and gonadal structure of F9～F11 allotetraploid crucian-carp. *Acta Genetica Sinica,* **30**（5）: 414-418.

Sun YD, Tao M, Liu SJ, Zhang C, Duan W, Shen JM, Wang J, Zeng C, Long Y, Liu Y. 2007. Induction of gynogenesis in red crucian carp using spermatozoa of blunt snout bream. *Progress in Natural Science,* **17**（2）: 163-167.

Tang SJ, Li SF, Cai WQ. 2008. Analysis of mitochondrial DNA in blunt snout bream（*Megalobrama amblycephala*）populations with different ploidy levels. *Journal of Fishery Sciences of China,* **15**（2）: 222-229. [唐首杰, 李思发, 蔡完其. 2008. 不同倍性团头鲂群体的线粒体 DNA 分析. 中国水产科学, **15**（2）: 222-229.]

Taniguchi N. 1992. Genetic improvement by gynogenesis-selection method. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh,* **44**（4）: 135-147.

Wang J, Wu HX, Yang XX, Ma YQ, Qian L, Li SF, Wang CH. 2011. Genetic variability analysis of Chinese and Hungarian northern pike（*Esox lucius* L.）based on microsatellite markers. *Journal of Fishery Sciences of China,* **18**（3）: 531-536. [王军, 吴惠仙, 杨新鑫, 马玉清, 钱龙, 李思发, 王成辉. 2011. 中国和匈牙利白斑狗鱼群体遗传变异的微卫星标记分析. 中国水产科学, **18**（3）: 531-536.]

Xiao J, Peng DJ, Duan W, Liu SJ, Sun YD, Long Y, Shen JM, Zhang C, Tao M, Liu Y. 2009. Induction of gynogenesis in goldfish using spermatozoa of blunt snout bream. *Acta Hydrobiologica Sinica,* **33**（1）: 76-81. [肖俊, 彭德姣, 段巍, 刘少军, 孙远东, 龙昱, 申佳珉, 张纯, 陶敏, 刘筠. 2009. 用团头鲂精子诱导金鱼雌核发育的研究. 水生生物学报, **33**（1）: 76-81.]

Xiao J, Zou TM, Chen L, Liu SJ, Xiao J, Zhang H, Long Y, Yan JP, Zhao RR, Tao M, Zhang C, You CP, Liu Y. 2011. Microsatellite analysis of different ploidy offspring of artificial gynogenesis in *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology,* **78**（1）: 150-165.

Zhang XZ, Feng GH, Zhang SM, Wang K. 1991. Studies on good character and germplasmid of Megalabrama amblycephala Yih in Yunihu Lake of Hubei province. *Freshwater Fisheries,* （3）: 12-16. [张兴忠, 冯光化, 张四明, 王凯. 1991. 湖北淤泥湖团头鲂优良性状及种质研究. 淡水渔业,（3）, 12-16.]

Zhao JL, Li SF, Cai WQ, Zou SM. 2000. Biochemical genetic marker of gynogenetic population of blunt snout bream（*Megalobrama amblycephala*）. *Journal of Shanghai Fisheries University,* **9**（2）: 166-168. [赵金良, 李思发, 蔡完其, 邹曙明. 团头鲂雌核发育生化遗传标记的初步研究. 上海水产大学学报, **9**（2）: 166-168.]

Zhu XC, Liu HJ, Sun XW, Xue LL, Mao LJ. 2006. Assessment of homozygosity in gynogenetic diploid using microsatellite markers in Japanese Flounder（*Paralichthys olivaceus*）. *Zoological Research,* **27**（1）: 63-67. [朱晓琛, 刘海金, 孙效文, 薛玲玲, 毛连菊. 微卫星评价牙鲆雌核发育二倍体纯合性. 动物学研究, **27**（1）: 63-67.]

附表Ⅰ 在团头鲂、雌核发育团头鲂及翘嘴红鲌的 15 对微卫星引物扩增条带

Supplementary Table Ⅰ Amplified bands in *M. amblycephala*, Gynogenetic *M. amblycephala* and *E .ilishaeformis* using 15 pairs of microsatellite primers.

引物 Primers	团头鲂 *M. amblycephala*		雌核发育团头鲂 Gynogenetic *M. amblycephala*		翘嘴红鲌 *E. ilishaeformis*	
	条带数 Number of fragments	估计大小（bp） Estimated sizes	条带数 Number of fragments	估计大小（bp） Estimated sizes	条带数 Number of fragments	估计大小（bp） Estimated sizes
TTF01	4	270, 264, 260, 258	4	270, 268, 264, 260	5	270, 264, 260, 258 , 250
TTF02	3	242, 238, 217	2	242, 238	4	242, 238, 236, 217
TTF03	4	242, 240, 238, 236	3	242, 240, 238	3	242, 240, 238
TTF04	5	201, 197, 193, 185, 181	3	197, 193, 185	4	197, 185, 181, 170
TTF05	5	176, 174, 172, 168, 164	3	174, 172, 168	4	174, 172, 168, 164
TTF06	5	190, 186, 182, 178, 172	5	190, 186, 182, 178, 172	3	190, 186, 182
TTF07	5	206, 198, 196, 188, 186	4	206, 198, 196, 188	2	198, 196
TTF08	3	290, 286, 284	2	290, 286	2	235, 220
TTF09	4	280, 276, 274, 272	4	280, 276, 274, 272	4	280, 276, 274, 272
TTF10	4	196, 194, 190, 188	4	196, 194, 190, 188	3	196, 194, 188
TTF11	4	172, 170, 168, 166	2	170, 168	4	172, 170, 168, 166
TTF12	5	168, 166, 162, 160, 158	3	162, 160, 158	5	168, 166, 162, 160, 158
TTF13	4	190, 186, 166, 162	4	190, 186, 166, 162	2	186, 166
TTF14	2	185, 164	2	185, 164	3	185, 176, 164
TTF15	3	254, 210, 186	3	254, 210, 186	2	254, 210